

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15737

研究課題名(和文)胎盤細胞におけるm6A修飾の機能及び、妊娠合併症の機能解明

研究課題名(英文)Fuction of m6A RNA modifications in human placenta.

研究代表者

谷口 公介(Taniguchi, Kosuke)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・メディカルゲノムセンター・研究員

研究者番号：90808718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なmRNAメチル化修飾であるN6-メチルアデノシン(m6A)と疾患との関連が近年報告され始めた。m6A修飾のヒト胎盤での機能は未解明である。本研究では様々な胎児発育の児や妊娠合併症のヒト胎盤を用いて網羅的m6A解析を行った。胎盤mRNAの5'UTRはm6A修飾は胎児発育群、合併症群でユニークな特徴を持っていた。さらに、胎児発育群毎や合併症群で正常と比べ発現量に差はないが、m6A量に有意差を認めたmRNAを多数同定した。その中の一遺伝子のm6Aの機能解析を通じて、5'UTRのm6Aが翻訳促進を介してタンパク質量に差を生じ、総じて胎盤機能に影響する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト胎盤でのm6A修飾の機能を世界で初めて報告した。様々な胎児発育例や妊娠合併症の病態解明において、mRNA量の比較では同定できなかった関連遺伝子を多数同定し得た。mRNAメチル化修飾による転写後調節を考慮することで、詳細や原因が未だ不明である生体現象や疾患の病態解明に役立つことが予想される。

研究成果の概要(英文)：The association between N6-methyladenosine (m6A) -a typical mRNA methylation modification- and disease have begun to be reported. However, the function of m6A modification in human placenta has not been elucidated.

In this study, we performed a comprehensive m6A analysis using the human placenta of various birth weight neonates and a pregnancy complication in order to elucidate the function of m6A modification in the human placenta.

The m6A at the 5'UTR of placental mRNA had unique m6A modification in each fetal development group and a pregnancy complication group. We identified a number of mRNAs that showed a significant difference in the amount of m6A in each fetal development group and a pregnancy complication group compared with the control group, although there was no difference in the expression level. Our results suggested that the m6A at the 5'UTR might promote protein translation, which could affect placental function.

研究分野：エピトランスクリプトーム

キーワード：mRNAメチル化 N6メチルアデノシン 胎盤 胎児発育 妊娠高血圧腎症 エピトランスクリプトーム  
トランスクリプトーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年提唱された epitranscriptome とは、RNA の化学修飾により、遺伝子発現調節を制御する機構を指す。mRNA の化学修飾は、mRNA の安定性、タンパク質翻訳調節などに cis に働く。その代表的な mRNA 修飾であるアデノシンメチル化修飾; N6-メチルアデノシン(m<sup>6</sup>A)は真核生物の mRNA に豊富で、様々な生体現象に関わる。次世代シーケンサーを用いた網羅的解析手法により、m<sup>6</sup>A 修飾の意義が近年さらに解明され始めた。m<sup>6</sup>A 修飾は転写後調節因子として、遺伝子発現量を調節することが分かってきた。主に、m<sup>6</sup>A 修飾は stop codon 近傍に多く、特異的な標的 motif 配列を持つ。また m<sup>6</sup>A 修飾による転写後調節が急性骨髄性白血病、固形がん、虚血性心疾患など幅広い疾患の病態との関連を示す報告が散見され始めている。

### 2. 研究の目的

我々は、胎児発育に及ぼす胎盤機能の解明研究を目指している。ヒト胎盤で m<sup>6</sup>Aeraser 遺伝子である *FTO* の発現が胎児発育と関連するという報告から、我々はヒト胎盤 mRNA 内の m<sup>6</sup>A 修飾の意義に注目した。m<sup>6</sup>A 修飾による遺伝子発現調節が胎盤機能を変化させ、胎児発育や代表的な妊娠合併症である妊娠高血圧腎症に関連するという仮説を立て、本研究では、これまで報告のなかった正常ヒト胎盤 m<sup>6</sup>A 修飾のプロファイリングを行い、胎児発育や妊娠高血圧腎症の病態解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

施設内の倫理委員会の承認を得た研究計画に対するインフォームドコンセントを得た上で、患者から胎盤を収集した。正常出生体重児(Appropriate for data: AFD) : 6 検体、妊娠高血圧腎症(Preeclampsia : PE)かつ small for date(SFD) : 3 検体、SFD : 3 検体、heavy for date(HFD) : 5 検体の様々な胎児発育の胎盤、合計 17 検体を収集した。全て帝王切開症例とした。胎盤組織から脱落膜を除き、母体血を十分洗い流した上で絨毛を採取し、すぐに RNA を抽出した。Poly(A)精製を行なった上で、抗 m<sup>6</sup>A 抗体を用いた免疫沈降法を併用し次世代シーケンサーを使って網羅的 m<sup>6</sup>A 修飾解析(m<sup>6</sup>A-specific methylated RNA immunoprecipitation with next generation sequencing : MeRIP-seq)を行なった。同時に RNAseq も行い、m<sup>6</sup>A 修飾部位を同定した。解析に関しては、独自の RNAseq パイプライン及び、m<sup>6</sup>A 修飾部位スクリプトを作成した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト胎盤 mRNA における m<sup>6</sup>A 修飾プロファイリング

正常出生体重児(AFD)の胎盤 mRNA を用いて MeRIP-seq を行うと、他の細胞種を用いた既報と同様に胎盤でも m<sup>6</sup>A 修飾は stop codon 近傍に最も高頻度に検出された(Fig1)。さらに、細胞種や組織間の違いを確認するために、HEK293T と human ES cell の細胞株の MeRIP-seq データとヒト胎盤データを比較したところ、mRNA の 5'非翻訳領域(5' UTR)の m<sup>6</sup>A 修飾量に細胞間で差を認めた(Fig1)。

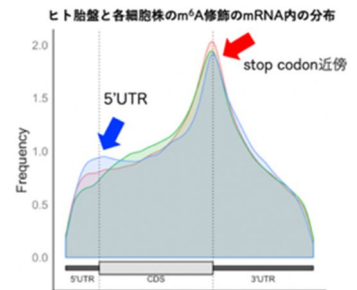


Figure 1

#### (2) 胎盤 mRNA の 5' UTR の m<sup>6</sup>A 修飾は胎児発育カテゴリーでユニークな特徴を持つ

様々な出生体重及の 17 胎盤を収集し MeRIP-seq を行なったところ、胎盤と各種細胞種の検討と同様に、検体間の m<sup>6</sup>A 修飾量の差は 5' UTR に最も顕著に認められた(Fig2)。一方、どの検体も stop codon 近傍に m<sup>6</sup>A 修飾を最も多く認めた。以上の結果より、5' UTR と stop codon 近傍の 2 つの領域に注目し、転写産物内の m<sup>6</sup>A 修飾をそれぞれの部位ごとに集計し比較した。その結果、各 mRNA の 5' UTR の m<sup>6</sup>A 修飾量に基づいて検体をクラスター分類すると、胎児発育カテゴリー毎に検体が分類された(Fig3)。一方、mRNA の発現量にはカテゴリー間で差が認められなかった。

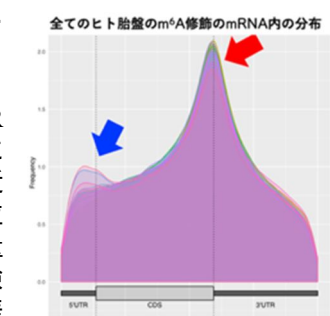


Figure 2

#### mRNAの5'UTRのm<sup>6</sup>A量を用いた階層的クラスタリング

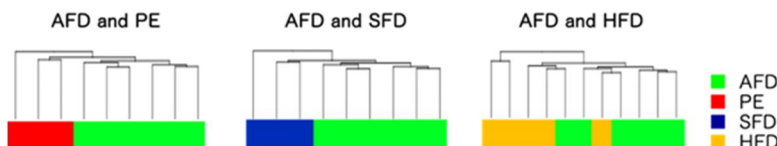


Figure 3

(注)

Appropriate for data: AFD  
Preeclampsia : PE  
small for date(SFD)  
heavy for date(HFD)

(3) 5' UTR の m<sup>6</sup>A 修飾は特定の遺伝子の翻訳効率を促進する

胎児発育カテゴリー間で m<sup>6</sup>A 修飾変動を認めた遺伝子群の pathway 解析を行ったところ、妊娠高血圧腎症胎盤の 5' UTR で m<sup>6</sup>A 修飾が有意に変化する遺伝子群の中でスフィンゴ脂質の恒常性に関する経路が有意に検出され、その中にセラミド合成遺伝子 *SMPD1* が含まれていた。過去の報告からセラミドは妊娠高血圧腎症胎盤で増加すること、*SMPD1* は遺伝子発現に変化はなく、mRNA 量とタンパク質発現量に乖離があることが知られていた。そこで我々は、これらの現象に 5'UTR の m<sup>6</sup>A 修飾が関連していると仮説を立てた。AFD 及び妊娠高血圧腎症胎盤での *SMPD1* のタンパク質量、mRNA 量、5'UTR での m<sup>6</sup>A 修飾量を比較すると、妊娠高血圧腎症胎盤では *SMPD1* タンパク質レベルが AFD に比べ有意に高いにもかかわらず、既報通り mRNA 量に差はなかった。しかし、*SMPD1* mRNA の 5'UTR の m<sup>6</sup>A 修飾は有意に妊娠高血圧腎症胎盤で高かった(Fig4)。そこで、*SMPD1* の 5' UTR 内にある m<sup>6</sup>A 修飾標的 motif 内の 2 箇所の A を T に変異させ、5' UTR mRNA m<sup>6</sup>A 修飾がタンパク質発現量に及ぼす影響を luciferase assay を用いて確認した。その結果、変異挿入プラスミドでは野生型に比べて有意に luciferase 活性が低下していた(Fig5)。以上の結果より、妊娠高血圧腎症胎盤では、*SMPD1* の mRNA 量は変えず、5' UTR の m<sup>6</sup>A 修飾増加を介して翻訳を促進し、病態に関与している可能性を示した。

本研究により、mRNA の 5' UTR における m<sup>6</sup>A 修飾を介した転写後調節による、ヒト胎盤の遺伝子発現調節機構が見出された。*SMPD1* に限らず、ヒト胎盤で発現する mRNA の 5' UTR の m<sup>6</sup>A 修飾は、胎児発育や妊娠高血圧腎症と関連する特徴を持つことが示唆された。本研究で同定した *SMPD1* と妊娠高血圧腎症の関連は従来の transcriptome では判明せず、epitranscriptome によって初めて関連を示唆する結果を得ることが出来た。今後は、これらの遺伝子群の詳細な検討により未だ解明されていない妊娠合併症の病態解明に迫ることができると考える。

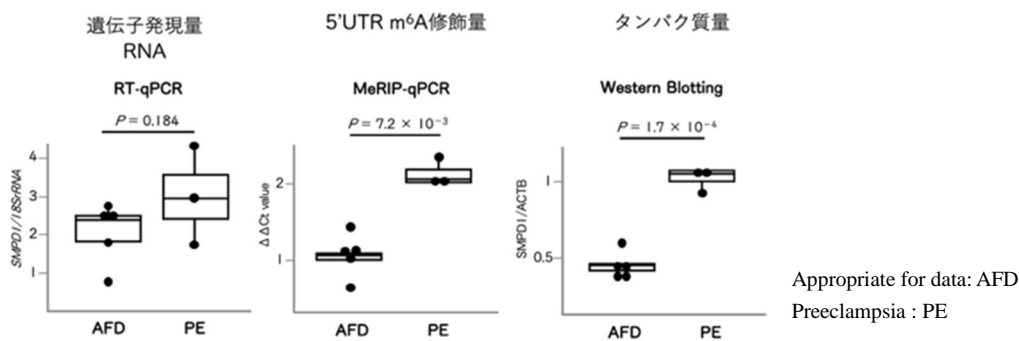


Figure 4

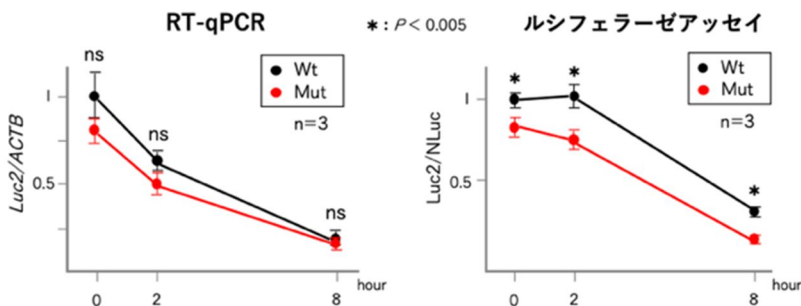


Figure 5

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kosuke Taniguchi Tomoko Kawai Jo Kitawaki Junko Tomikawa Kazuhiko Nakabayashi Kohji Okamura Haruhiko Sago Kenichiro Hata	4. 巻 34
2. 論文標題 Epitranscriptomic Profiling in Human Placenta: N6-methyladenosine Modification at the 5'-untranslated Region Is Related to Fetal Growth and Preeclampsia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB J	6. 最初と最後の頁 494-512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201900619RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----